

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-23696

(P2000-23696A)

(43)公開日 平成12年1月25日(2000.1.25)

(51) Int.Cl.
 C 12 Q 1/56
 A 61 K 31/00
 38/46
 C 12 N 9/50
 C 12 Q 1/37

識別記号

6 0 7

F I
 C 12 Q 1/56
 A 61 K 31/00
 C 12 N 9/50
 C 12 Q 1/37
 G 01 N 33/566

テーマコード(参考)

6 0 7 B

審査請求 未請求 請求項の数27 OL (全18頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平11-116411

(22)出願日 平成11年4月23日(1999.4.23)

(31)優先権主張番号 19818495 : 6
 (32)優先日 平成10年4月24日(1998.4.24)
 (33)優先権主張国 ドイツ (DE)
 (31)優先権主張番号 19851332 : 1
 (32)優先日 平成10年11月6日(1998.11.6)
 (33)優先権主張国 ドイツ (DE)
 (31)優先権主張番号 19851335 : 6
 (32)優先日 平成10年11月6日(1998.11.6)
 (33)優先権主張国 ドイツ (DE)

(71)出願人 597070264

ツエンテオン・ファルマ・ゲゼルシャフト
ト・ミット・ベシユレンケル・ハフツングCENTEON PHARMA GMBH
ドイツ連邦共和国デー-35002マルブルク。
ボストフアハ1230

(72)発明者 イュルゲン・レーミシュ

ドイツ連邦共和国デー-35041マルブルク。
ツム・アイゼンベルク8

(74)代理人 100091731

弁理士 高木 千嘉 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 血液凝固第VII因子を活性化するプロテアーゼ

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 新規なFVII活性化プロテアーゼの発見とその応用。

【解決手段】 a) アプロチニンの存在によって阻害され、b) カルシウムイオンおよび/またはヘパリンもしくはヘパリン類縁物質によってその活性が上昇し、またc) SDS-PAGEにおいて、以後の非還元状態での染色では分子量50~75kDaの範囲の1個もしくは2個以上のバンドを示し、還元状態では分子量10~35kDaの範囲の1個もしくは2個以上のバンドを示す。血液凝固第VII因子を活性化するプロテアーゼならびにそのプロ酵素は、血漿またはプロトロンビン複合体(PPSB)濃縮物から予め陰イオン交換クロマトグラフィーに付したのち、ヘパリンもしくはヘパリン類縁物質またはデキストラン硫酸を用いる親和性クロマトグラフィーによって得られる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) アプロチニンの存在によって阻害され、b) カルシウムイオンおよび/またはヘパリンもしくはヘパリン関連物質によりその活性は上昇し、c) SDS-PAGEにおいて、それに続く非還元状態での染色により分子量50~75kDaの範囲の1個もしくは2個以上のバンドを示し、還元状態では分子量40~55kDaに1個のバンドおよび分子量10~35kDaの範囲の1個または2個以上のバンドを示す血液凝固第VII因子を活性化するプロテアーゼ。

【請求項2】 SDS-PAGEにおいて還元状態で分子量60~65kDaおよび40~55kDaの範囲に得られるバンドはアミノ酸配列：LLESLDPを有し、分子量10~35kDaの範囲に得られるバンドはアミノ酸配列：IYGGFKSTAGKを有する請求項1記載のプロテアーゼ。

【請求項3】 血漿またはプロトロンビン複合体（PPSB）濃縮物の分画によって得られる請求項1または2に記載のプロテアーゼ。

【請求項4】 SDS-PAGEにおいて還元状態で得られるバンドは60~65kDaの範囲の分子量を有し、アミノ酸配列：LLESLDPおよびIYGGFKSTAGKを含有する請求項1~3のいずれかに記載のプロテアーゼのプロ酵素。

【請求項5】 請求項1~3のいずれかに記載のプロテアーゼもしくは請求項4に記載のプロ酵素を取得または除去する方法において、それを血漿またはプロトロンビン（PPSB）濃縮物から、それを前もって陰イオン交換クロマトグラフィーに付したのち、ヘパリンもしくはヘパリン関連物質またはデキストラン硫酸を用いる親和性クロマトグラフィーによって得る方法。

【請求項6】 請求項1~3のいずれかに記載のプロテアーゼもしくは請求項4に記載のプロ酵素を免疫学的に検出するための試薬において、プロテアーゼまたはプロ酵素に対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を含有する試薬。

【請求項7】 診断/分析の目的での試薬において、請求項1~3のいずれかに記載のプロテアーゼおよび/または請求項4に記載のプロ酵素を、所望によりプロ酵素のアクティベーターとともに含有する試薬。

【請求項8】 第VII因子の検出のための試薬において、請求項1~4に記載のプロテアーゼ/プロ酵素を、所望によりプロテアーゼ活性増強化合物とともに含有する試薬。

【請求項9】 請求項1に記載のプロテアーゼまたは請求項4に記載のそのプロ酵素の定性的および定量的検出のための試験システムにおいて、そのプロテアーゼ活性は、

a) 血液凝固第VIII/VIIIa因子もしくは第V/Va因子を不活性化するその活性または

2

b) 包括的血液凝固試験における血液凝固時間を低下させるその活性または

c) プラスミノーゲンアクティベーターを活性化するその活性または

d) FVIIを活性化するその活性によって測定する試験システム。

【請求項10】 請求項9に記載の試験システムにおいて、血液凝固時間を低下させる活性は、

a) 非活性化部分トロンボプラスチン時間（NAPTT）または

b) プロトロンビン時間（PT）または

c) 血漿カルシウム再沈着時間または

d) 活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）によって測定する試験システム。

【請求項11】 請求項9および10に記載の試験システムにおいて、プラスミノーゲンアクティベーターを活性化および/または増強する活性は、

a) 一本鎖ウロキナーゼPA（scuPA、一本鎖ウロキナーゼプラスミノーゲンアクティベーター）または

b) 一本鎖tPA（sctPA、一本鎖組織プラスミノーゲンアクティベーター）の活性化により測定する試験システム。

【請求項12】 請求項9~11に記載の試験システムにおいてカルシウムイオン0.001mM以上の量、好ましくは0.005mM以上の量を含む試験システム。

【請求項13】 プロテアーゼおよび/またはプロ酵素と適当なプロ酵素アクティベーターの混合物をプロトロンビン時間置換組織因子/トロンボプラスチンの試験に使用するアッセイシステム。

【請求項14】 プロテアーゼおよび/またはプロ酵素と適当なプロ酵素アクティベーターの混合物を、プラスミノーゲンアクティベーターの機能性の試験ならびに一本鎖プラスミノーゲンアクティベーター型の定量に使用するアッセイシステム。

【請求項15】 請求項9~14に記載の試験システムにおいて、プラスミノーゲンアクティベーターを増強する活性は、

a) 色素原試験を用いて測定するかまたは

b) プラスミノーゲンの存在下におけるカップリング反応でプラスミン自体の形成もしくはプラスミンによってもたらされるフィブリン凝血の溶解で測定する試験システム。

【請求項16】 血液凝固第VII因子を活性化するプロテアーゼの阻害の結果としての蛋白分解により形成される不活性な第VIII因子および第V因子フラグメントを含まない安定化第V因子および安定化第VIII因子アレバレーション。

【請求項17】 血液凝固第VII因子を活性化するプロテアーゼを阻害するために、第VIII因子または第V因子

50 アレバレーション中のカルシウムイオン濃度を1.0m

3

M未満、好ましくは0.5 mM未満とする請求項16記載の安定化プレバレーション。

【請求項18】 FVIIIまたはFV含有溶液を固定化ヘパリン、固定化ヘパリン様物質または固定化デキストラン硫酸と接触させ、結果として完全にまたは部分的にプロテアーゼ/プロ酵素を含まない溶液を得る請求項17に記載の安定化プレバレーション。

【請求項19】 天然または合成プロテアーゼインヒビターの添加によって血液凝固第VII因子を活性化するプロテアーゼによる蛋白分解から保護された請求項17および18に記載の安定化プレバレーション。

【請求項20】 緩衝溶液の添加によりpHを4.0～9.0に調整し、および/またはエチレングリコールもしくはグリセロール5～80重量%を含有する請求項1～4に記載のプロテアーゼまたはプロ酵素の安定化溶液。

【請求項21】 フィブリン含有血栓の溶解に適当な量の、血液凝固第VII因子を活性化するプロテアーゼおよび/またはそのプロ酵素を含有する医薬製剤。

【請求項22】 血液凝固第VII因子を活性化するプロテアーゼおよび/またはそのプロ酵素のほかに、一本鎖または二本鎖プラスミノーゲンアクティベーター(PA)および/または抗血液凝固剤を含有する請求項21記載の医薬製剤。

【請求項23】 さらに可溶性カルシウム塩および/またはヘパリンもしくはヘパリン様物質を含有する請求項21または22に記載の医薬製剤。

【請求項24】 請求項1～4に記載のプロテアーゼおよび/またはそのプロ酵素の阻害のために、プロテアーゼインヒビターたとえばアプロチニンおよび/またはC₁-インヒビターおよび/またはα₂-アンチプラスミンおよび/またはインターα-トリプシンインヒビターおよび/またはATIII/ヘパリンを含有する血液の凝固性を低下させるための医薬製剤。

【請求項25】 請求項1～4に記載のプロテアーゼおよび/またはそのプロ酵素からなる医薬製剤の製造方法において、滅菌条件下で、

- a) pH範囲は3.5～8.0とし、
- b) 1種または2種以上のアミノ酸>0.01 mol/L量を加え、および/または
- c) 糖もしくは多数の糖の組合せ総量>0.05 g/ml量を加え、および/または
- d) カルシウムイオンと錯体を形成できる物質1種または2種以上を加えることからなる方法。

【請求項26】 請求項25に記載の方法によって得られる医薬製剤。

【請求項27】 請求項1～4に記載のように血漿もしくはプロトロンビン複合体(PPSB)濃縮物から調製されるかまたは組換えもしくは遺伝子導入によって発現させたプロテアーゼまたはそのプロ酵素の、所望により

4

プロ酵素アクティベーターとともに、フィブリンに基づく迅速な創傷閉鎖に適当なフィブリン接着もしくは被覆または他の放出系の添加物として創傷治癒および止血の促進のため、このプロテアーゼまたはそのプロ酵素の先天的または後天的欠損状態の置換のため、血液凝固第VII因子に対する抗体の存在下、または血液凝固第VII因子のインビトロ活性化のための使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

10 【発明の属する技術分野】 本発明は血液凝固第VII因子の活性化のためのプロテアーゼ、それを単離、検出および不活性化する方法ならびにこのプロテアーゼからなる医薬製剤に関する。

【0002】

【従来技術】 血液凝固系は、血漿中に存在する血液凝固因子を活性化する2つの異なるカスケード様経路から構成される。その誘導機構によって、内因系または外因系経路が血液凝固の開始に優先的に使用される。

20 【0003】 組織が傷害された場合、トロンボプラスチック(組織因子、TFとリン脂質)が外因性凝血経路のスターとして冒された細胞により暴露される。膜局在性のトロンボプラスチックは、血液凝固第VII因子(FVII)および循環する、活性化FVII(FVIIa)の両者を結合することができる。カルシウムイオンおよび脂質の存在下に、このTF-FVIIa複合体はFXの結合を招き、これは限定された蛋白分解によってその活性化型(FXa)に変換される。続いてFXaはプロトロンビンを活性化してトロンビンを形成することにより、フィブリンの形成を招来し、それによって最終的に創傷の閉鎖が起こる。

【0004】 トロンボプラスチック結合FVIIの更なる活性化は最初は自触反応によって起こるが、特に、凝血カスケードの開始後には、それはFXaおよびトロンビンによって支持され、特に反応カスケードの著しい強化を招くことになる。

【0005】 FVIIaまたはFVIIa含有濃縮物の投与はある種の臨床状態に適用されている。たとえば、血友病Aに冒されFVIII投与の結果としてFVIIIに対する抗体が発生している患者では、FVIIaのいわゆるFVIII副経路活性(FEIBA)が用いられる。現時点で分かれている所見によれば、FVIIaはこの関係で十分な耐容性を有し、それは血栓傾向を生じることはなく、限られているが適切な程度の凝血が起こることを保証するのに適している。組換えFVIIaは既に治療的および予防的に使用されている。血漿から単離されたFVIIはまた、活性化されてから用いることができる。トロンビンのようなプロテアーゼをこの活性化に使用できるが、しかしながら、これらのプロテアーゼは、それら自体凝血を強力に活性化することが可能で、血栓の危険を招くことがある。この理由から、以後のトロンビンの除去また

は不活性化が必要であり、損失を生じることになる。それに伴う血栓の危険の結果として、多くの場合、FXaもしくはFIIa(トロンビン)の使用は禁忌とされ、緊急時、たとえば血液の著しい喪失および止血不能の出血の関連でのみ適用される。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】FVIIaは、健康人の血漿中にはきわめて低濃度でしか見出されない。血液中を循環するFVIIaの形成および起源についてはこれまでほとんど知られていない。細胞の破壊に伴って発現または放出された痕跡のトロンボアラスチンはこの関連である役割を果たしている可能性がある。第XIIa因子は、たとえばある種の条件下にFVIIの活性化を生じることが知られているが、この反応の生理学的な関連はまだ明らかにされていない。

【0007】驚くべきことに今回、従来知られているすべてのプロテアーゼとは異なるFVII活性化プロテアーゼが、ヒト血漿およびある種のプロトロンビン複合体濃縮物の分画に関連し発見された。このプロテアーゼの検討から、それはChronogenix AB, Swedenからのペプチド基質S 2288(HD-イソロイシルーレーブロリル-レーアルギニン-pNA)に対して特に高いアミド分解活性を示すことが示された。このプロテアーゼの特殊な性質は、そのアミド分解活性がアプロチニンによって効果的に阻害されることである。他のインヒビター、たとえばアンチトロンビンIII/ヘパリン複合体もその阻害に適している。他方、その活性はヘパリンおよびヘパリン関連物質たとえばヘパリン硫酸またはデキストラン硫酸およびカルシウムイオンにより上昇する。最後に、このプロテアーゼは、時間およびその濃度に依存する様式でFVIIをFVIIaに変換できることが見出された。この反応もアプロチニンによって阻害される。

【0008】

【課題を解決するための手段】したがって、本発明の主題の一部は、
a) アプロチニンの存在によって阻害され、
b) その活性はカルシウムイオンおよび/またはヘパリンもしくはヘパリン関連物質によって上昇し、そして
c) SDS-PAGEにおいて、以後の非還元状態での染色では分子量50~75kDaの範囲に1個もしくは2個以上のバンドを示し、還元状態では分子量40~55kDaに1個のバンドならびに分子量10~35kDaの範囲の1個もしくは2個以上のバンドを示す、血液凝固第VII因子を活性化するプロテアーゼである。

【0009】

【発明の実施の形態】以下の明細書においては、そのプロテアーゼの活性化型を「プロテアーゼ」と呼び、非活性化型を「プロ酵素」と呼ぶ。

【0010】このプロテアーゼについてさらに検討し、濃縮または単離後には急速な活性の喪失を受け、それは

20 mM tris、0.15M NaClを含有するpH 7.5の溶液中で観察された。濃度0.1%のアルブミンの添加も、このプロテアーゼの活性が室温で1時間後に50%まで低下するのを防止することはできなかつた。他方、50 mMのクエン酸ナトリウムによりpH 6.5に緩衝した溶液中では、このプロテアーゼのきわめて良好な安定化が観察された。溶液をpH 4~7.2好ましくはpH 5.0~7.0に調整すると、プロテアーゼ溶液に特に安定剤を加えなくても活性の喪失は全くまたはきわめてわずかしか認められなかつた。しかしながら、溶液には安定化剤を添加することが得策であり、適当な安定剤としてはクエン酸塩のほかに、特にグルタメート、アミノ酸たとえばアルギニン、グリシンまたはリジン、カルシウムイオンおよび糖たとえばグルコース、アラビノースまたはマンノースの1~200 mmol/L好ましくは5~100 mmol/L量を挙げることができる。有効な安定化は、グリコールたとえばエチレングリコールまたはグリセロール5~80重量%の添加によつても達成され、好ましくは10~60重量%が使用される。その場合、安定化された溶液のpH値は4~9でなければならない。

【0011】新規なプロテアーゼ、および同じくそのプロ酵素は、粗挽えDNA法、またはたとえば適当なトランシジェニック動物の乳汁中における産生によって得られ、特に血漿もしくはプロトロンビン複合体(PPS B)濃縮物の分画化によって得ることができる。出発原料をついで最初に陰イオン交換クロマトグラフィーに付し、続いて、溶出液の親和性クロマトグラフィーを行う。親和性クロマトグラフィーにはマトリックス上に固定化されたヘパリンまたはヘパリン関連物質たとえばヘパリン硫酸またはデキストラン硫酸が特に適している。このようなクロマトグラフィー法を用いた場合、新規なプロテアーゼおよび/またはプロ酵素は選択的に結合され、ついで既知の方法を用いて再び溶出することができる。マトリックスにリガンドをカップリングするためには、スペーサーの使用を推奨できる。新規プロテアーゼの単離にはヘパリン-リジンマトリックスが特に適していることが見出されている。

【0012】SDS-PAGEとそれに続く染色では、この方法によって単離されたプロテアーゼは、非還元状態において、分子量55~75kDaの範囲の互いに接近した存在する1個から数個のバンドを示す。還元後には、分子量15~35kDaの範囲に1個から数個のバンドが観察され、1個のバンドが40~55kDaに観察された。60~65kDaのさらに1個のバンドは、走査および定量的評価後、総タンパク質の5~10%を構成し、非活性化プロ酵素も存在することが示された。この結果は、このプロテアーゼに対するモノクローナル抗体を使用する適当な検討によって支持された。したがって、このプロテアーゼのプロ酵素もまた、本発明の方

法により調製し、滅菌し、使用することができると結論された。本発明の主題の一部は、したがって、血液凝固第VII因子を活性化するプロテアーゼのプロ酵素である。プロ酵素の比率は60~65 kDaのバンドにより指示される。プロ酵素の適当な生理学的アクティベーターの例は、それらの基質特異性に応じて、プロ酵素、トロンビン、カリクレインまたはFVIIaの活性化領域を構成するアミノ酸配列に相当する。

【0013】上述した新規なプロテアーゼの性質の一部、すなわちそれが血漿または血漿に由来するプロトロンビン複合体(PPSB)濃縮物から単離できるという事実、そのアミド分解活性のアプロチニンによる阻害ならびに還元および非還元状態の両者でのSDS-PAGEにおける上述の泳動挙動は、Hunfeldら(Ann. Hematol. 1997, 74: A87, 113; Ann. Hematol. 1998, 76: A10 1, P294 および Etscheidら, Ann. Hematol. 1999, 78: A42)によって詳細は定義されていないPPSB濃縮*

バンドの分子量範囲	アミノ酸配列	報告者
10~35 kDa	IYGGFKSTAGK	本発明
30 kDa	IYGGFKSTAG	Hunfeldら
17 kDa	IYGGFKSTAGKH	Choi-Miuraら
40~55 kDa	LLESLDP	本発明
50 kDa	SLDP	Hunfeldら
57 kDa	SLLESLDPWTPD	Choi-Miuraら

一致は他の試験結果たとえば基質特異性および阻害される活性の能力にも見出される。それにもかかわらず、現時点ではこれらのタンパク質が同一であるとの推定はなお不可能である。いずれにしても、以前に研究された上述のタンパク質にはFVIIaまたは他の因子の活性化の性質をもつことは報告されていない(下記参照)。

【0016】その上述の性質に基づいて、その新規なプロテアーゼは診断的および治療的に使用することができる。

【0017】1. 新規なプロテアーゼを用いる試験システム

新規なプロテアーゼは試験試薬中に診断的に使用することができます。すなわち第VII因子の存在は新規なプロテアーゼの添加により血液凝固試験において定性的および定量的に決定することができる。

【0018】それとは逆に、FVIIの活性化を測定するために開発されたこの試験システムはプロテアーゼの検出および定量にも使用することができる。このためには、プロテアーゼを含有する溶液をFVII含有溶液と混合し、適当なインキュベーション時間後に生成したFVIIaの両を定量する。これは、たとえば Staclot^(R) FVIIa-rTF テスト(Stago/Boehringer Mannheim)を用いて実施できる。好ましい操作を用いた場合は、この試験は供給されるFVIIの濃度には限定されない。総タンパク質の比率の型でのプロテアーゼ量を知る場合には、その比率は:一純粋なプロテアーゼプレバレー^{※50}

* 物から単離されたプロテアーゼを想起させる。その場合は、調製は主としてアプロチニンマトリックスを用いて達成された。ある種のペプチド基質のアミド分解による切断の結果として、活性はトロンビン様活性と記述されている。Hunfeldらは包括的な血液凝固パラメーターたとえばプロトロンビン時間、クワイックまたは血小板凝集に対する影響は全く見出していない。

【0014】Hunfeldらにより記載されたプロテアーゼのN末端配列決定は、そのcDNAがChoi-Miuraら(J. Biochem. 119: 1157-1165, 1996)により報告されたタンパク質の場合と一致を示す。その一次構造では、相当するタンパク質が肝細胞増殖因子活性化酵素(HGFA)と命名されている酵素とホモロジーを示す。

【0015】SDS-PAGEから還元条件下に単離された2つのバンドをN末端配列決定に付し、以下の一致が確立された。

※シナ中、キエルダール法または本技術分野の熟練者には周知の他のタンパク質のアッセイ法により、またはたとえば特異的な抗体に基づく抗原試験および適当な免疫化学的測定方法たとえばELISAを用いて決定することが可能であり、ついでプロテアーゼプレバレーションの比活性を相当する様式で測定することができる。

【0019】驚くべきことに、プロテアーゼの特性の異なる解明に伴い、付加的な測定を可能にする性質が新たに見出された。上記プロテアーゼと血液凝固VIII/VIIIaおよびV/Va因子のインキュベーション、それに続く定量に関連して、上記血液凝固因子はプロテアーゼ濃度およびインキュベーションの長さには無関係な様式で不活性化されることが明らかにされた。

【0020】本発明の主題の他の一部は、したがって、血液凝固第VII因子を活性化するプロテアーゼを定性的および定量的に検出する新規な試験システムであり、このシステムにおいては、プロテアーゼは血液凝固第VIII/VIIIaまたはV/Va因子を不活性化するその活性によって定量することができる。この試験システムは、プロテアーゼを含有する溶液を第VIII/VIIIaまたはV/Va因子とインキュベートして、残留した第VIII/VIIIa因子の量または残留したV/Va因子の量を慣用の活性試験によって測定し、ついでこれからプロテアーゼの量を標準曲線との比較により決定する操作に基づくものである。この試験の実施に際し、プロテアーゼ活性のインキュベーションを予め定められた時間、限られた量のアブ

ロチニンの添加によって阻害すると、これらの濃度では試験システムの以後の測定に影響しないという利点がある。その後、血液凝固因子の残留活性を本技術分野の熟練者に周知の試験方法で測定する。このためには、主として第IXおよびX因子を含有し、得られたFXaの量をトロンボインヒビターの存在下に色素原基質の変換により定量するいわゆるCoamatic^(R)第VIII因子テスト(Chromogenix AB)を使用可能にする点で([0007]の記述参照)、特に試験システムの価値が証明されている。一方、この量は、FVIIまたはFVIIaの量に比例する。ついで、残留するFVIII活性を決定すれば、存在するプロテアーゼの濃度を帰納することが可能になる。

【0021】蛋白分解作用によるFVIII/FVIIIaまたはFV/FVa因子の分解は、SDS-PAGEによって明瞭に証明できる。プロテアーゼをたとえばFVIII濃縮物とインキュベートした時間に依存して、FVIIIに典型的なバンドは消失し、一方、他の新しいバンドが発生し、または弱いバンドの強度が増大する。したがって、プロテアーゼの活性はまた、バンドの減弱または増強を定量することにより関連づけることが可能で、その結果、たとえばプロテアーゼ標品を用いて定量的に測定することができる。SDS-PAGE電気泳動図におけるバンドの強度、または他の電気泳動法によるバンドの強度の変化を、本技術分野の熟練者には周知のたとえばスキヤーおよび適当なプログラムを用いて定量することができる。これに加えて、上記血液凝固因子に対する抗体はウエスタンプロットに使用可能であり、また上述の方法における評価に採用することができる。減弱したバンドまたは、特に発生したバンドを特異的に検出する抗体が特に適している。これに関連して、これらの抗体は他の免疫化学的試験、たとえばELISAの確立にも使用することができる。

【0022】FVIII/FVIIIaの場合に記載された蛋白分解的不活性化はまた、FVIIIとある程度の構造的ホモロジーを示す第V/Va因子とプロテアーゼをインキュベートした場合にも観察される。分解は適当な活性試験システムおよびSDS-PAGE/ウエスタンプロッティングにおいてモニターできる。

【0023】FVおよびFVIIIの不活性化にもかかわらず、今回、血液、血小板濃縮血漿または血漿へのプロテアーゼの添加は血液凝固時間を短縮すること、すなわち各種のいわゆる「包括的血液凝固試験」において卓越したプロコアギュラント活性を示すことが見出された。これらの試験システムは、たとえば、非活性化部分トロンボプラスチン時間(NAPTT)、プロトロンビン時間(PT)およびカルシウム再沈着時間であると理解される。たとえばいわゆる血液凝固計において、血栓弾性記録計により、またはほかに色素原試験で測定されるこれらの時間の短縮化は、血液凝固促進物質の濃度と相関す

るので、サンプル中のその物質の濃度は、血液凝固時間の検量曲線を使用して逆に推論することができる。「FVIIアクティベーター」の濃度は同様、選択された包括的血液凝固試験を用いて決定することができる。

【0024】「FVIIアクティベーター」は同様に、單一鎖ウロキナーゼ(scuPA、單一鎖ウロキナーゼプラスミノーゲンアクティベーター)、および單一鎖tPA(sctPA、單一鎖組織プラスミノーゲンアクティベーター)の効果的なアクティベーターをもたらすことができる。すなわちプラスミノーゲンアクティベーター(AktiV)として作用できることがまた驚くべきことに見出された。活性化PAの活性はたとえば、色素原物質を用いて測定できる。すなわちこの性質は、したがって、「FVIIアクティベーター」の検出および定量化に使用することができる。プラスミノーゲンアクティベーターの活性化はまた、プラスミノーゲンの存在下、プラスミンそれ自身の形成によりまたはプラスミンによってもたらされるフィブリン凝血の溶解により、カップリング反応で決定することができる。

【0025】したがって、要約すれば、プロテアーゼはそれをFVIIIまたはFVIIIaを含有する溶液とインキュベートし、ついでFVIII/FVIIIaの残存量を適当な活性試験により検出および定量の両者が可能であるということができる。同じ方法でFVまたはFVaをプロテアーゼとインキュベートし、FV/FVaの残存量をついで定量することができる。未知のプロテアーゼ濃度は試験に含まれるプロテアーゼの量の上昇を標準曲線と比較して定量的に決定することができる。様々な包括的血液凝固試験が同様に定量化に適しており、プロテアーゼ濃度は凝固時間の短縮に基づいて検量曲線から読み取られる。プロテアーゼのPAA活性も定量の目的に使用することができる。

【0026】これらの試験の特徴は、FVおよびFVIII不活性化ならびにPAA活性が適当な高濃度のカルシウム、好ましくは>0.001mM、特に好ましくは>0.005mMをCaCl₂の形で存在させると、特に良好に発揮されることである。上述のように、ヘパリンおよびヘパリン様物質の両者およびカルシウムもプロテアーゼ活性を上昇させる直接的な色素原アッセイの場合とは対照的に、FV/FVIIIの不活性化はヘパリンによっては促進されないか、または有意ではない促進が認められるにすぎない。これに反し、PAA活性はいずれの物質の存在でも、すなわちカルシウムおよび/またはヘパリンもしくはヘパリン様物質によって刺激される。

【0027】プロテアーゼ誘導反応は、プロテアーゼをインヒビター特にヘパリンまたはヘパリン様物質の存在下(好ましくはヘパリンの存在下)アンチトロンビンII、C1-エステラーゼインヒビター、α₂-アンチプラスミン、インター-α-トリプシンインヒビターまたは既知の低分子量プロテアーゼインヒビターたとえば商品名

11

FOY^(R)として入手できるグアニジノカプロン酸-p-エトキシカルボニルフェニルエステルとインキュベートすることによってきわめて効率的に減弱または防止することができる。これらの物質は、したがって、たとえばインキュベーション時間を正確に決定するため、または試験の特異性をさらに上昇させる目的で、反応を停止するために使用することができる。混合物中の遊離のカルシウムイオンをたとえばキレート剤で減少させると、この目的に使用することもできる。

【0028】2. 第Vおよび第VIII因子の安定化された
プレパレーション

血液凝固第Vおよび第VIII因子に対する新規プロテアーゼの蛋白分解活性に関する上述の観察からプロテアーゼ活性の阻害またはその活性の減弱の課題が、生成の喪失および、多分妨害性タンパク質のフラグメントと考えられる断片の形成を回避するために生じる。これはすべて、FVおよびFVIIIが血漿より得られた寒冷沈殿物からカルシウムイオンの存在下に通常調製され、後者はタンパク質のコンフォーメーションの維持に要求されるところから、益々重要である。

【0029】本発明の主題の他の部分は、したがって、血液凝固第VII因子を活性化するプロテアーゼが阻害されるとい事實の結果としての蛋白分解により形成された第Vおよび第VIII因子フラグメントを含まないFVまたはFVIIIの安定化されたプレパレーションである。さらに詳細な検討によって、上記プロテアーゼによる第Vおよび第VIII因子の不活性化は特に0.5 mM以上の濃度のカルシウムイオンの存在下において効率的に起こることが示されたことから、血液凝固第VII因子を活性化するプロテアーゼの阻害のために第Vまたは第VIII因子プレパレーション中のカルシウムイオンの濃度を1.0 mM未満、好ましくは0.5 mM未満に調整すると第Vおよび第VIII因子のアレパレーションを効率的に安定化することができる。プロテアーゼの第Vおよび第VIII因子不活性化作用はこれらの濃度で著しく低下するが、カルシウムイオンの量はFVおよびFVIII分子のコンフォーメーションを安定化するのになお十分である。上述のカルシウムイオン量は、単に最終製品においてのみではなく、寒冷沈殿物自体および以後の精製工程でも過剰になってはならない。

【0030】プロテアーゼまたはプロ酵素のヘパリンおよびヘパリン様物質に対する上述の親和性により、プロテアーゼ/プロ酵素はFVIIIまたはFV含有溶液から、固定化ヘパリンまたは他の免疫性もしくは親和性吸着物質とインキュベートすることによって除去できる。免疫性吸着物質の調製に有用なポリクローナルまたはモノクローナル抗体、それぞれの抗体フラグメントは本技術分野において既知の技術により、プロテアーゼまたはプロ酵素の全体または部分を抗原として用い、容易に入手することができる。

12

【0031】しかしながら、FVまたはFVIIIの蛋白分解を防止するためには、カルシウムイオン量の低下に加え適宜、天然または合成プロテアーゼインヒビターを使用することもできる。アプロチニン、 α_2 -アンチアラスミン、C1-エステラーゼインヒビターまたはインターリップシンインヒビターのような蛋白質もインヒビターとして使用できる。本技術分野の熟練者には合成セリンプロテアーゼインヒビターとして知られている低分子量物質もこれに関連して使用することができる。阻害強度がヘパリンまたはヘパリノイドによって上昇するアンチトロンビンIIIのようなインヒビターも同様に添加できる。すなわち、ヘパリンはそれ自身、小色素原物質に対するプロテアーゼのアミド分解活性を増大できるが、それはFV/FVIIIの不活性化を支持しないことが驚くべきことに見出された。

【0032】3. 新規プロテアーゼからなる医薬

新規なプロテアーゼおよび/またはプロ酵素は治療的に用いることができる。それらはそれら単独、またはプロテアーゼの活性を増大させる物質、たとえばヘパリンまたはヘパリン関連物質、たとえばヘパリン硫酸、および/またはカルシウムイオンとともに使用することができる。この薬剤にはさらに、第VII因子を同様に添加することも可能である。そのFVIII副経路活性(FE I B A)を利用するこのような薬剤の使用は、たとえば、FVIIIおよび/またはFIXおよび/またはFXIおよび/または接触相タンパク質たとえばFXIIに対してたとえば抗体の存在のために耐容性が存在する場合、または他のタイプの欠損状態が存在する場合に適用することができる。この関連で、FVIIIはインヒビトロ、血漿中、濃縮分画中のいずれかまたは精製FVII上に対する作用により活性化することができる。また、新規な血液凝固剤は、全身性の出血の予防のためまたは出血を停止させるためにエキソビオで使用することも可能である。

【0033】他方、アプロチニンまたは上述のインヒビターによる新規プロテアーゼの観察された阻害は、プロテアーゼインヒビターからなり血液を凝固させる能力が減弱した薬剤の開発に使用できる。これに加えて、新規なプロテアーゼはまた、それらのプロテアーゼ阻害作用によって血液凝固を損なう生理学的および非生理学的原因たとえば合成ペプチドを同定するためにも使用できる。特に効率的にトランスフォームされる色素原基質、たとえばS2288(詳細は上記参照)のペプチド配列はこのための構造的基盤として使用することができる。これらのアレパレーションが蛋白分解活性を含まない場合には、凝血アレパレーションに対する適当なインヒビターの添加が、それらの調製時にも必要なことがある。

【0034】プロテアーゼの特性がさらに解明されるに伴い、いわゆる「第VII因子アクティベーター」プロテアーゼとしての付加的用途の可能性を開く性質が発見された。一本鎖プラスミノーゲンアクティベーター、たと

13

えば、プロウロキナーゼ（一本鎖ウロキナーゼ、sucPA、一本鎖ウロキナーゼアラスミノーゲンアクティベーター）またはsctPA（一本鎖組織アラスミノーゲンアクティベーター）をインキュベートすると、「第VII因子アクティベーター」がこれらのアラスミノーゲンアクティベーター（PA）の活性化をもたらす。これに関連して、一本鎖PAの蛋白分解には限界があり、二重鎖プロテアーゼの形成を生じ、これは特にアラスミノーゲンの活性化に適している。生成したアラスミンはフィブリン溶解のエフェクター、すなわち血栓の溶解に関与する生理学的システムである。プロウロキナーゼまたはsPAのようなPAは、必要に応じて放出され、また既知のようにアラスミンまたはカリクリein（scuPA）によって活性化される内因性タンパク質である。健康状態においてscuPAが活性化される機構は、まだ完全には解明されていない。

【0035】アラスミノーゲンアクティベーターは、血栓性疾患または併発症たとえば大腿静脈血栓症、心筋梗塞または卒中に関連した医薬製剤中において、単離もしくは粗換えによって調製されたタンパク質として治療的に使用することができる。

【0036】今回発見された「第VII因子アクティベーター」の性質により、後者はアラスミノーゲンアクティベーターたとえばウロキナーゼまたはsctPAのインピボまたはエキソビボ活性化に使用することができる。この活性はまたこのプロテアーゼを、特に一本鎖または二本鎖アラスミノーゲンアクティベーターまたは抗凝固剤と組合わせて同様に、血栓塞栓性疾患の予防または治療のための使用に適用できる。この使用の可能性は、プロテアーゼがまたプロコアグラント様式で作用できる事実と矛盾しない。2つの反応のどちらが優先するかの問題は生理学的物質の利用性によって多分解決される。現時点での知識によれば、第VII因子は血漿中で中程度に活性化されて、突然の血管障害に直ちに対処できるようにある濃度に絶えず維持されている。他方、組織アラスミノーゲンアクティベーターならびにウロキナーゼアラスミノーゲンアクティベーターは血漿1ml中にわずかナノグラム単位の量で存在するのみである。その濃度がアラスミノーゲンアクティベーターの分泌または合成によって上昇するのはフィブリンの沈着または血栓が起こった場合のみで、それらはついで、局所的に特にそれらが血栓に結合した場合に活性化されたのち、アラスミノーゲンを活性化して、それらの血栓溶解作用を発揮する。一本鎖PAが存在する場合、特に局所的に限定された様式ではそれらの活性化がFVIIの活性化を上回り、それにより生理学的状態への調整が可能になる。したがって、このプロテアーゼはまた止血を調整し、それによって先天的または後天的欠損状態の症例におけるプロテアーゼおよび/またはプロ酵素による置換に適用される可能性がある。

14

【0037】したがって本発明の主題の他の部分は、血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼおよび/またはそのプロ酵素型の、フィブリン含有血栓を溶解するのに十分な量からなる医薬製剤である。この製剤はさらに、一本鎖アラスミノーゲンアクティベーター（PA）および/または抗凝固剤を含有させることもできる。プロ酵素が存在する場合には、上述の医薬製剤内にまたはそれとともに、適当な活性化剤を使用することも有利である。

【0038】「FVIIアクティベーター」のアラスミノーゲンアクティベーター増強作用は、特にカルシウムおよび/またはヘパリンおよびヘパリン様物質たとえばデキストラン硫酸によって促進されることが見出されたことから、さらに可溶性カルシウム塩および/またはヘパリンもしくはヘパリン様物質を含有する医薬製剤は、フィブリン含有血栓を本発明によって溶解するために有利に使用できる。これに関連して、プロテアーゼ/プロ酵素はその単独または一本鎖または二本鎖アラスミノーゲンアクティベーターと組合せ、所望によりプロテアーゼに対して特定の親和性を發揮し、それによって血漿中半減期を延長する担体物質としてまたは表面へのメディエーターとしてその活性を増大させる物質とともに使用することができる。

【0039】血液凝固第VII因子活性化プロテアーゼからなる医薬製剤は、その特異的なフィブリン溶解作用により、フィブリン含有血栓によって引き起こされる疾患の処置に使用することができる。フィブリン溶解過程はまた創傷治癒過程に関与する。この関連で、上記プロテアーゼおよび/またはプロ酵素は、静脈内もしくは局部的、皮下、皮内または筋肉内あるいは傷害もしくは創傷の場合は局所的にまたは適当な担体マトリックスに結合させて投与することができる。体液たとえば血液または血漿から単離されたプロテアーゼ/プロ酵素および粗換えまたは遺伝子導入により調製されたプロテアーゼ/プロ酵素はいずれもこの関連で使用できる。プロテアーゼ/プロ酵素はまた、いわゆるフィブリン接着剤の成分としても適当で、これにはアプロチニンのようなプロテアーゼ/プロ酵素を阻害する物質を含有してはならない。この場合、プロテアーゼの凝血短縮作用が利用される。

【0040】上記プロテアーゼ/プロ酵素は、先天性または後天性止血欠損、(汎発性)出血の発生、各種血栓関連併発症に使用することができる。出血の処置に使用する場合は、プロテアーゼ/プロ酵素をFVIIIとともに、所望により、さらに他の凝血因子を付加することが有利である。

【0041】4. FVII活性化プロテアーゼを滅菌する方法

ヒト血漿から単離されたタンパク質であるから、新規なプロテアーゼおよび/またはそのプロ酵素は、予めウイルスを不活性化する処理に付した場合にのみ、医薬製剤50として使用することができる。滅菌過程が特にウイルス

15

の不活性化に最も重要な過程として認識されている。しかしながら、処理すべきタンパク質には約60°Cで10時間までの過熱に適当な安定性が要求される。各タンパク質について至適な安定剤を別個に決定し、それらの濃度を至適化しなければならない。新規なプロテアーゼおよび/またはそのプロ酵素の場合、滅菌は行わない溶液中のタンパク質を安定化する条件は既に上述した。この場合わずかに酸性のpHが特に有利なことが証明されている。しかしながら、これらの条件下に滅菌を行うと、新規なプロテアーゼおよび/またはそのプロ酵素では通常、元の活性の50%以上が失われる。

【0042】新規なプロテアーゼおよび/またはそのプロ酵素からなる医薬製剤の滅菌は、プレバレーションを
 a) pH範囲3.5~8.0、好ましくはpH範囲4.0~6.8;
 b) 添加した1種または2種以上のアミノ酸0.01mol/L以上、好ましくは0.05mol/L以上の存在下；および/または
 c) 添加した1種の糖または異なる糖の組合せ、総濃度0.05g/ml以上、好ましくは0.2g/ml以上の存在下；および/または
 d) 添加したカルシウムイオンと錯体を形成できる物質たとえばクエン酸、シュウ酸、エチレンジアミン四酢酸等1種または2種以上の存在下に調製されると、至適な安定化結果が保証される。

【0043】添加物たとえばアルブミン、Haemaccel^{1(R)}、ヘパリンおよびヘパリノイド、グリセロール、グリコールおよびポリエチレングリコールを別個にまたは一緒に混合して使用することができる。滅菌が完了したのち、安定剤として添加した糖、アミノ酸および他の添加物は、本技術分野の熟練者には周知の方法を用いてプレバレーションから減量または完全に除去することができる。滅菌過程の結果は実施例12および13に示す。

【0044】

【実施例】実施例1

調製されたプロテアーゼによるFVIIの活性化を、Stachot^(R) FVIIa-rTFテストシステム(Stago/Boehringer Mannheim)を用いて証明した。この検出システムは、予め形成された活性化FVII(FVIIa)を外因系凝固経路の阻害にのみ使用できる特定の性質(組換え)可溶性組織因子(rTF)に基づくものである。これは、完全な組織因子を用いた場合とは異なり、FVIIaの実際の含有量を正確に決定することを可能にする。

【0045】単離されたFVII(Enzyme Research Labs)を用いて活性化実験を行った。このFVII自体はヒト血漿から単離されたために痕跡のFVIIaを含んでいた。緩衝液で希釈して濃度をFVII 0.05IU/mlに調整した。FVIIを試験物質と室温で10分間インキュベートし、ついで真のFVIIa含量を試験した。FVIIa含量は平行して構築した標準曲線を用いて定量した。

16

【0046】本明細書には記載していない予備実験で、用いた濃度ではアプロチニンは調製されたプロテアーゼの活性を完全に阻害したが、FVIIaに直接の作用をもたず、FVIIa-rTFテストシステムに有意な影響を示さないことが確認された。以下に掲げる結果は、各場合、三重の測定に関する。すなわち、以下の実験は次のようにセットアップされた。

【0047】1. FVII: 対照アッセイとしては非活性化FVIIを使用した。これは、既に痕跡のFVIIaを(上記参照)をFVIIa 1.0mIU/mlのオーダーで含有している。

【0048】2. FVII+アプロチニン: このアッセイでは、FVIIはアプロチニンの存在下にインキュベートし、FVIIa自体は阻害されないことまたテストは用いたアプロチニンによって影響されないことを証明するために、FVIIa-rTFアッセイを使用した。これは確認された(アッセイ1との比較で)。

【0049】3. プロテアーゼ+FVII(インキュベート)ついでアプロチニンの添加:

結果: FVIIa 1.8mIU/ml

この場合、プロテアーゼにはFVIIaを活性化する時間を与えた。アプロチニンはプロテアーゼをそがいするため単に添加し、10分間のインキュベーション後に行われた。得られたFVIIaをFVIIa-rTFアッセイで定量した。すなわち、FVIIaの基底値(アッセイ1)を差し引くと、選択された条件下でのプロテアーゼの活性によってFVIIa 8mIU/mlが形成された。

【0050】4. プロテアーゼ+アプロチニン、ついでFVIIの添加:

結果: FVIIa 1.1mIU/ml

このアッセイでは、プロテアーゼをFVIIと接触させる前にアプロチニンで阻害した。以後のFVIIとのインキュベーションでもまた続くFVIIaの定量でも、有意なFVIIa含量の上昇は生じなかった(アッセイにおける変動の範囲、すなわち、アッセイ1における1.1と1.0mIU/mlは有意とはみなされない)。

【0051】5. プロテアーゼ:

結果: FVIIa 0mIU/ml

このアッセイでは、選択された濃度においてプロテアーゼはそれ自体FVIIa-rTFテストシステムに何ら影響を与えないことが証明された。要約すれば、以上から記述したプロテアーゼはFVIIを活性化する;

-プロテアーゼによるFVIIの活性化は「直接」、すなわち、rTFの存在とは独立に起こる;

-FVIIの活性化はアプロチニンによって阻害される;アプロチニンそれ自体はテストシステムに何ら有意な影響は与えない;と結論される。

【0052】実施例2

この実施例はプロテアーゼの濃度およびプロテアーゼがFVIIとインキュベートされた時間とは独立の反応にお

50

いて、FVIIがいかにして活性化されるかを説明する。テストシステムおよび試薬は実施例1の記載に相当するように選択された。最初のシリーズの実験では、最初に導入されたFVIIは様々な希釈度(1:5, 1:10および1:20)のプロテアーゼ含有溶液とインキュベートし(室温5分)、ついでアプロチニン(プロテアーゼを阻害する)で処理し、続いて、そのFVIIa含量をFVIIa-rTFアッセイにおいて試験した。この場合も、プロテアーゼをFVIIと接触させる前にアプロチニンによって阻害したアッセイを平行して行い、対照とした。

【0053】結果は活性化係数として与える。すなわち、上述の対照アッセイで測定された値のx倍に相当する。

アッセイ: プロテアーゼ+FVII、インキュベーション、+アプロチニン

対照: プロテアーゼ+アプロチニン、インキュベーション+FVII

【表1】

プロテアーゼ溶液の希釈度	活性化係数	
	アッセイ	対照
1:5	2.6	1.0
1:10	2.0	1.0
1:20	1.6	1.0

これから、FVIIはプロテアーゼにより、プロテアーゼの濃度に依存する様式で活性化されると結論される。

【0054】共反応物質の濃度を一定に保持した場合、FVIIはインキュベーションの長さとは独立の様式で、プロテアーゼによって活性化されることも同様に証明された。FVII 0.2IU/mlおよび1:10-希釈プロテアーゼ溶液を含有する溶液の等容量を一緒にインキュベートした場合には、相当時間のインキュベーション後にアプロチニンを添加して(活性化を停止させるため)、以下のFVIIa含量が得られた。

【表2】

インキュベーションの長さ	活性化係数
0 分	1.0
2.5 分	1.3
5.0 分	2.0
10.0 分	2.8
40.0 分	>3.8

これから、FVIIは、プロテアーゼによって時間依存性の様式で活性化されると結論される。

【0055】実施例3

この実施例を用い、FVIIのプロテアーゼによる活性化はカルシウムイオンおよびヘパリンの存在によって増大することを証明することとする。25μlのプロテアーゼ含有溶液を、50μlの一緩衝液(対照)

-15mM CaCl₂
-ヘパリン 50USP単位/ml
-Pathromtin(脂質混合物、アリコートを製造業者の指示書に従って溶解)と室温で5分間混合し、ついで150μlのtris/NaCl緩衝液(pH8.2)および25μlの色素原基質S2288(3mM)で処理し、ついで405nmにおける吸光度の経時的变化を測定した(37°C)。緩衝液対照に対する活性化係数(x倍)は下表に示す。

10 【表3】

	活性化係数(緩衝液対照に対する倍数x)
緩衝液対照	1.0
+CaCl ₂	3.6
+ヘパリン	2.6
+脂質	0.9
+CaCl ₂ +ヘパリン	4.3
+CaCl ₂ +脂質	3.3
+ヘパリン+脂質	2.7
20 +CaCl ₂ +ヘパリン+脂質	3.7

この実施例で用いた条件下には、プロテアーゼ活性の著しい上昇をカルシウムイオンおよび/またはヘパリンの存在下に観察することができる。

【0056】実施例4

いずれの場合も、プロテアーゼ1.0、1または0.1μg/mlを含有する溶液を、25μlのFVII(2IU/ml)と混合したのち、25μlのCaCl₂(25mM)および25μlのPathromtin(R)(Dade Behring GmbH)を加えた。37°Cにおいて0、3、10および20分間インキュベートしたのち、400μlのアプロチニン(500KIU/mg)を添加して反応を停止させた。アプロチニンを最初に添加したサンプルを対照として用いた。

【0057】各サンプルをtris緩衝液/BSAに希釈した。各場合、この溶液50μlを因子試薬[主としてFIXa、FXおよびトロンビンインヒビターからなり、Cosmatic(R) FVIIIテスト、Chromogenix ABに従って改変]50μlと混合し、37°Cにおいて10分間インキュベートした。50μlの基質(たとえばS276

40 5、N-a-Cbo-D-Arg-Gly-Arg-pNA)を加えていたのち、既定時間のインキュベーション後に50μlの酢酸(50%)を添加して反応を停止させ、ついでOD_{405nm}を測定した。FVIIIの標準曲線を用いてサンプル中の濃度を決定した。

【0058】結果: 最初のアッセイでは、プロテアーゼをFVIII(2IU/ml)とインキュベートする時間を一定(10分)に保持したが、プロテアーゼの濃度は変動させた(0.1、1および10μg/ml)。反応を停止させ、活性なFVIIIの残留濃度を測定した。プロテアーゼ

50 濃度が上昇すると、それに対応してFVIIIは不活性化さ

19

れた(図1)。サンプルのプロテアーゼ含量は適当な標準曲線を用いて定量化できる。第二のアッセイではプロテアーゼの濃度を一定に保持して($10\text{ }\mu\text{g/ml}$)、FVIII(2IU/ml)とインキュベーション時間を変動させた。活性なFVIIIの残留濃度の著しい低下がインキュベーション時間の延長とともに認められた(図2)。

【0059】実施例5

第V因子の活性に対する「FVIIアクティベーター」の影響を検討した。 $25\mu\text{l}$ のプロテアーゼ含有溶液(0~ $100\text{ }\mu\text{g/ml}$)を $50\mu\text{l}$ のFV(5IU/ml)および $2 * 10$

* $5\mu\text{l}$ のCaCl₂とインキュベートし(0~20分)、ついで 100KIU/ml のアプロチニンを含む緩衝液 $400\mu\text{l}$ を加えた。いずれの場合も、各 $100\mu\text{l}$ のインキュベーションアッセイをついで $100\mu\text{l}$ のFV欠乏血漿と 37°C で1分間インキュベートし、次に $200\mu\text{l}$ のTrömbofibrinogen S^(R)を加えて混合し、Schnitger & Gross 血液凝固計で血液凝固時間を測定した。FVの残留活性を決定した。

結果:

プロテアーゼ濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	FVの残留活性		
	0	10	20
10	93	91	100
30	100	93	28
100	100	29	13

この実施例では、FVがプロテアーゼによって経時に不活性化されたことが証明される。

【0060】実施例6

「FVIIアクティベーター」のいわゆる包括的試験における血液凝固時間に対する影響を、Schnitger & Gross 血液凝固計を用いて検討した。掲げた差の値は、すべてこの量で短縮された血液凝固時間に相当する。

【0061】NAPTT(非活性化部分トロンボプラスチン時間)

プロテアーゼ含有溶液を緩衝液で 100 、 30 、 10 およ

よび $3\text{ }\mu\text{g/ml}$ に希釈した。これらの溶液それぞれ $100\mu\text{l}$ を、 $100\mu\text{l}$ の加クエン酸血漿(標準血漿プールまたは個々のドナーから)および $100\mu\text{l}$ のPathromt 20 n^(R)と 37°C で2分間インキュベートし、ついで $100\mu\text{l}$ の 25mM CaCl₂を加え、ついで血液凝固時間を測定した。これらの測定値とプロテアーゼに代えて緩衝液を用いて得られた相当する血液凝固時間の間の差を求めた。

【表5】

サンプル番号	血液凝固時間の差(緩衝液-サンプル、秒)				
	0	3	10	30	100
標準ヒト血漿(213秒)	0	13	20	42	43
1	0	20	33	42	41
2	0	27	31	45	47
3	0	13	14	23	29
4	0	18	37	51	50
5	0	25	49	54	46

FVIIアクティベーターの添加はNAPTTの濃度依存性の短縮を生じた。

【0062】血漿カルシウム再沈殿時間

プロテアーゼ含有溶液を緩衝液で 100 、 30 、 10 および $3\text{ }\mu\text{g/ml}$ に希釈した。これらの溶液それぞれ $100\mu\text{l}$ を、 $100\mu\text{l}$ の加クエン酸血漿(標準血漿プー

★ルまたは個々のドナーから)と 37°C で1分間インキュベートし、ついで $100\mu\text{l}$ の 25mM CaCl₂を加え、ついで血液凝固時間を測定した。これらの測定値とプロテアーゼに代えて緩衝液を用いて得られた相当する血液凝固時間の間の差を求めた。

【表6】

21

サンプル番号	血液凝固時間の差(緩衝液-サンプル、秒)				
	0	3	10	30	100
標準ヒト血漿(283秒)	0	17.2	15.1	30.5	50.4
1	0	29.8	51.7	60.3	90.1
2	0	25.2	51.7	69.5	101.3
3	0	28.0	—	39.0	74.6
4	0	27.3	42.7	55.6	91.8
5	0	44.3	69.1	101.2	134.2

【0063】PT(プロトロンビン時間)

プロテアーゼ含有溶液を緩衝液で100、30、10および3μg/mlに希釈した。これらの溶液それぞれ10μlを、100μlの加クエン酸血漿(標準血漿アルまたは個々のドナーから)と37°Cで1分間インキュベ*

*ーし、ついで200μlのThromborel S(R)(Dade Behring GmbH)を加え、ついで血液凝固時間を測定した。これらの測定値とプロテアーゼに代えて緩衝液を用いて得られた相当する血液凝固時間の間の差を求めた。

【表7】
血液凝固時間の差(緩衝液-サンプル、秒)

サンプル番号	プロテアーゼ濃度(μg/ml)				
	0	3	10	30	100
標準ヒト血漿(13.6秒)	0	1.0	1.7	1.5	2.4
1	0	0.7	1.3	2.4	2.7
2	0	0.3	0.4	1.7	3.1
3	0	0.4	0.7	1.5	1.8
4	0	0.1	0.7	1.8	3.1
5	0	0.3	0.5	1.2	2.8

【0064】実施例7

「FVIIアクティベーター」のプラスミノーゲンアクティベーター活性化作用一本鎖ウロキナーゼ(scuPA)および一本鎖tPA(sctPA)を使用して検討した。

アッセイ:

0.1ml PA溶液(20μg/mlのscuPAまたは100μg/mlのsctPA)
+0.1ml 試験緩衝液または試験緩衝液中100U/mlのヘパリンまたは試験緩衝液中20mM CaCl₂
+0.5ml 試験緩衝液
+0.1ml プロテアーゼ/サンプル(濃度上昇; 2~10μg/mlのscuPAまたは50~200μg/mlのsctPA)
37°Cでインキュベーション

※+0.1ml 試験緩衝液中100IU/mlのアプロチニン
37°Cで2分間インキュベーション
+0.1ml 基質S-2444(3mM)

対照としては、最初のインキュベーションの前に、30スミノーゲンアクティベーター(PA)に代えてアプロチニンを最初に導入し、以下、各場合を通して同様に実施する。一方、PAは、以後アプロチニンの代わりに添加するまで加えなかった。測定値の差(△)△OD_{405nm}を光学的に測定した。得られた対照値をサンプル/プロテアーゼ値から差し引き、この方法で、PAA活性によって生じたPA活性を測定した(mIU/分)。

【0065】結果: scuPAの活性化(20μg/mlのscuPA、2~10μg/mlの「FVIIアクティベーター」)

【表8】

23
A. 刺激物質：なし

インキュベーション時間 (分)	
2	
5	
10	

得られたPA活性(ΔmIU/分)		
FVIIアクティベーター(μg/ml)		
2	5	10
25	60	117
79	179	165
186	449	517

B. 刺激物質：ヘパリン

インキュベーション時間 (分)	
2	
5	
10	

得られたPA活性(ΔmIU/分)		
FVIIアクティベーター(μg/ml)		
2	5	10
190	332	425
330	455	458
417	462	460

C. 刺激物質：CaCl₂

インキュベーション時間 (分)	
2	
5	
10	

得られたPA活性(ΔmIU/分)		
FVIIアクティベーター(μg/ml)		
2	5	10
255	370	401
338	424	438
416	445	448

表は、scuPAが「FVIIアクティベーター」の濃度およびインキュベーションの長さに依存する様式で活性化される事実を例示する。同時に、ヘパリンおよびカルシウムの両者がプロテアーゼによってもたらされたPAの活性化に刺激作用を示した。

【0066】scuPAの活性化(100μg/mlのscuPA、50～200μg/mlの「FVIIアクティベーター」)

*30

*活性化t PAの代謝回転速度はt PAプロ酵素に比較して係数3～4まで上昇するにすぎない(uPAの場合は係数1000～1500上昇する)ので、分析可能な測定シグナルを得るために、2種の共反応物質の高い濃度を選択しなければならなかった。

【表9】

25
A.

26

インキュベーション時間 (分)	得られたPA活性(ΔmIU/分)	
	FVIIアクティベーター(200μg/ml)	
1	10.2	
2	16.8	
5	38.8	
10	60.2	
20	73.3	

B. 「FVIIアクティベーター」の濃度依存性(インキュベーション、時間: 20分、37°C)、刺激物質: ヘパリン(100IU/ml)

FVIIアクティベーター (μg/ml)	PA活性(ΔmIU/分)
50	33.6
100	51.0
200	71.9

C. 刺激物質(インキュベーション、時間: 20分、37°C)

刺激物質	PA活性(ΔmIU/分)
なし	5.9
CaCl ₂	25.3
ヘパリン	63.8

表は sctPAもプロテアーゼの濃度およびインキュベーション時間に依存する様式で活性化されたことを証明する。ヘパリンおよびカルシウムイオンの両者が「FVIIアクティベーター」のPAの活性化能力に対して刺激作用を示した。

【0067】実施例8

2種のFVIII含有溶液、一方はフォン・ヴィルプラン因子を本質的に含まず、他方はvWFを含有する溶液を上述のプロテアーゼとカルシウムの存在下にインキュベートした。予め定められた時間後に、色素原試験によって残留FVIII活性を測定し、プロテアーゼを含まない対照アッセイと関連させた。

【0068】このためには、0.1IU/mlのFVIIIを含有する溶液25μlを同容量のプロテアーゼ溶液(μg/ml)で処理し、全体を25μlのCaCl₂(25mM)と混合した。0、5、10および20分間37°Cでインキュベートしたのち、プロテアーゼの蛋白分解活性を停止させるために各場合、200KIU/mlのアプロチニンを含有する溶液400μlで処理した。予備実験では、アプロ

* ロチニンのこの濃度はいかに記述するFVIII活性試験(アッセイ1+3)に有意な干渉作用をもたないことが示された。アッセイ2においては、プロテアーゼをFVIIと接触させる前にアプロチニンとインキュベートし、ついで上述のように操作した。

【0069】いずれの場合も、50μlの停止したサンプル(またはさらに希釈後)をついで主としてFIX、FXおよびトロンビンインヒビターからなる、いわゆる因子試薬で処理し、37°Cにおいて10分間インキュベートした。活性化FXによって切断される色素原基質50μlの添加に続いて5分間インキュベートしたのち50μlの酢酸(50%)を添加して反応を停止させ、ついでΔOD_{405nm}を測定した。FVIII活性(mIU)は、FVII濃縮物から調製し、テストに包含された希釈系列を用いて構築した標準曲線を利用して確認した。

【0070】FVIII活性はプロテアーゼを添加しなかった対照に対する百分率で示す。

40 結果:

【表10】

インキュベーション時間(分)	FVIII活性(%)			
	0	5	10	20
1. FVIII	97	27	11	<1
2. FVIII/アプロチニン	98	97	97	96
3. FVIII/vWF	98	16	14	1

CaCl₂(この場合は6.25mM)の存在下には、FVIIはプロテアーゼにより、インキュベーションの長さに依存した様式で不活性化された。vWFは、プロテアーゼによる不活性化からFVIIIを保護しなかった。

※vWFはアプロチニンでプロテアーゼを阻害すると、前者の不活性化は防止された。

【0071】実施例9

このシリーズの実験では、実施例1／アッセイ1を実施したが、この場合は、プロテアーゼとFVIIIの混合物中のカルシウム濃度を変動させた。このためには、CaCl₂をカルシウム保存溶液から図3に示す最終濃度まで添加した。

結果：アッセイ中のカルシウム濃度を1 mM未満に低下させると、これらの条件下に約50%のFVIIIが残留する。0.5 mM未満のカルシウムでは残留百分率は60%以上である（図1）。

【0072】実施例10

「FVIIアクティベーター」のいわゆる包括的試験における血液凝固時間に対する影響を血栓弾性記録法によって検討した。関連血餅の剪断弹性または強度の変化を、

Hilgard TEGメーター（Helligeより）を用いて連続的に*

血液番号	サンプル	r時間(分)	k時間(分)	r+k時間(分)
1	プロテアーゼ	5.2	3.4	8.6
1	緩衝液	7.8	5.6	13.4
2	プロテアーゼ	5.2	5.1	10.3
2	緩衝液	6.8	7.1	13.9
3	プロテアーゼ	4.0	5.2	9.2
3	緩衝液	6.5	6.3	12.8
4	プロテアーゼ	4.5	4.8	9.3
4	緩衝液	4.8	6.0	10.8
5	プロテアーゼ	4.2	3.8	8.0
5	緩衝液	7.0	5.8	12.8

血漿番号	サンプル	r時間(分)
1	プロテアーゼ	9.0
1	緩衝液	11.3
2	プロテアーゼ	9.2
2	緩衝液	12.5
3	プロテアーゼ	9.5
3	緩衝液	9.6
4	プロテアーゼ	8.2
4	緩衝液	12.1
5	プロテアーゼ	9.7
5	緩衝液	14.1

【0074】この実施例は、ほとんどすべての場合、プロテアーゼの添加は血液凝固時間の著しい短縮を起こすことを明らかにするものである。ここに示した例では「FVIIアクティベーター」のフィブリン溶解作用はバックグラウンド中に隠れてしまっていた。この理由は「正常対象」では血漿中のプラスミノーゲンアクティベーターの濃度がナノグラムの領域にあり、インビトロでの血液凝固試験には全く影響しないからである。

*記録した。いわゆるrおよびk値、それぞれ血液の停止の開始からおよび血液凝固反応の開始からの時間であり、加クエン酸血漿の場合にはTEG曲線までの再カルシウム沈殿の時間は1 mmまで広がり、r値の終点から曲線までの時間は20 mmに広がった（血餅形成時間）。

【0073】このためには、5例のドナーからの血液または血漿の150 μlのアリコートを各場合、測定キューベット中37°Cで2分間インキュベートし、ついで50 μlのサンプル（プロテアーゼ）を加え混合した。1000 μlの25 mM CaCl₂を加え、反応を開始させた。アッセイ中「FVIIアクティベーター」の終濃度は15 μg/mlであった。r時間の短縮をサンプルに代えて緩衝液を含有するアッセイに関して測定した。

結果：

【表11】

血液番号	サンプル	r時間(分)	k時間(分)	r+k時間(分)
1	プロテアーゼ	5.2	3.4	8.6
1	緩衝液	7.8	5.6	13.4
2	プロテアーゼ	5.2	5.1	10.3
2	緩衝液	6.8	7.1	13.9
3	プロテアーゼ	4.0	5.2	9.2
3	緩衝液	6.5	6.3	12.8
4	プロテアーゼ	4.5	4.8	9.3
4	緩衝液	4.8	6.0	10.8
5	プロテアーゼ	4.2	3.8	8.0
5	緩衝液	7.0	5.8	12.8

※【0075】実施例11

プロテアーゼのFVIII副経路活性は以下の実験的アッセイによって証明された。すなわち、測定技術として血栓弾性記録法を用いた。r時間を評価した（実施例10参照）。全血サンプルを、天然のFVIIIインヒビターの存在を刺激するために、そのFVIII活性阻害作用が分かれているモノクローナル抗体（FVIIIに対する抗体）とインキュベートした。サンプルを全血サンプル対照（Ma

※50 nM）と比較して評価した。

29

bに代えて緩衝液)と比較した。プロテアーゼのFE I B活性を、Mabによって阻害された全血サンプルにプロテアーゼ(終濃度17μg/ml)を加えて試験した。さらにサンプルにプロテアーゼを加え、プロテアーゼ自体のr時間に対する影響を測定した。

【0076】結果:

【表12】

	r時間	10
全血対照	8.0	
全血+mAb	11.0	
全血+mAb+プロテアーゼ	8.0	
全血+プロテアーゼ	3.5	

抗-FVIII mAbによって引き起こされるr時間の延長はこの場合もプロテアーゼの存在により正常化され、これはプロテアーゼのFE I B活性を例示するものである。既に上に証明したように、プロテアーゼそれ自体は血液凝固時間を短縮した。

【0077】実施例12

50μg/mlのFVII活性化プロテアーゼを含有する溶液に、以下の物質を相当する終濃度になるように加えた。

2.5mM クエン酸ナトリウム

2.5mM HEPES

1.00mM アルギニン

0.75g/ml スクロース

この溶液を部分に分割し、各場合、アリコートを5.0～8.6の様々なpH値に調製し、ついで60℃に10時間加熱した。加熱したプロテアーゼ溶液の活性は色素原試験により測定し色素原基質S2288(H-D-Ile-Pro-Arg-pHA×2HCl、Chromogenix AB, Sweden)の経時的なアミド分解を記録した。この活性は加熱しないで平行して測定されたアリコートの百分率として表示した。

*【0078】結果:

【表13】

アッセイ	活性(%)
出発原料	100
pH 5.0	76
pH 5.5	65
pH 6.1	81
pH 6.5	50
pH 7.1	43
pH 7.5	46
pH 8.1	46
pH 8.6	32

この一連の実験は、特に酸性のpH範囲における安定化はプロテアーゼの不活性化を著しく低下させた。pH 5.5におけるわずかな「ブレークスルー」はこの範囲にプロテアーゼの等電点があるという事実によって説明できる。クエン酸ナトリウムは好ましいpH範囲で起こる>50%の活性の喪失を防止する。

【0079】実施例13

pH 6.1におけるアッセイ(実施例1)はプロテアーゼの最良の安定化を示した。したがって、様々な活性を実施例1に記載のようにpH 6.0で試験して評価した。以下の終濃度をセットし、プロテアーゼの濃度は50μg/mlとした。

50mM クエン酸ナトリウム/50mM NaCl、pH 6.0

0.75g/mlのスクロース

1.00mMのグリシン

1.00mMのアルギニン

【0080】結果:

【表14】

アッセイ	活性(%)
出発原料	100
クエン酸ナトリウム/NaCl	54
クエン酸ナトリウム/NaCl/スクロース	85
クエン酸ナトリウム/NaCl/スクロース/グリシン	92
クエン酸ナトリウム/NaCl/スクロース/アルギニン	97

スクロースおよび各場合1種のアミノ酸の添加によってプロテアーゼの著しい安定化が証明された。

【図面の簡単な説明】

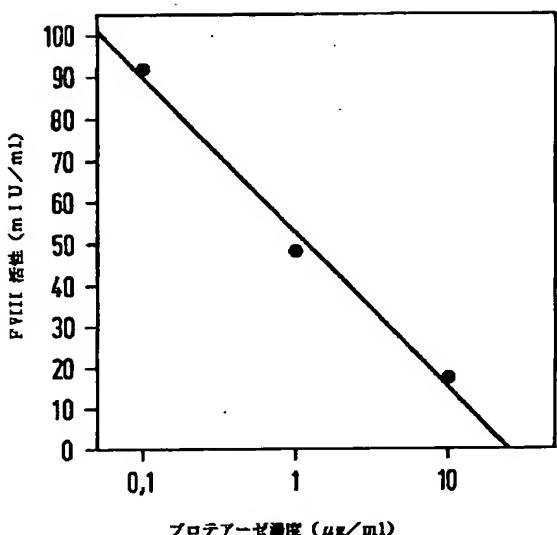
【図1】プロテアーゼとFVIIIを一定時間インキュベートした場合のプロテアーゼ濃度とFVIIIの不活性化を示す。

40※【図2】プロテアーゼ濃度を一定とし、FVIIIを様々な時間インキュベートした場合のFVIIIの不活性化を示す。

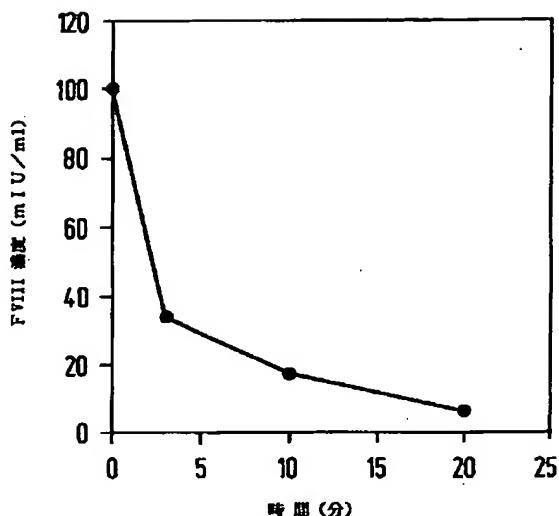
【図3】プロテアーゼとFVIIIを混合物中におけるカルシウム濃度を変動させインキュベートした場合のFVIIIの不活性化を示す。

※

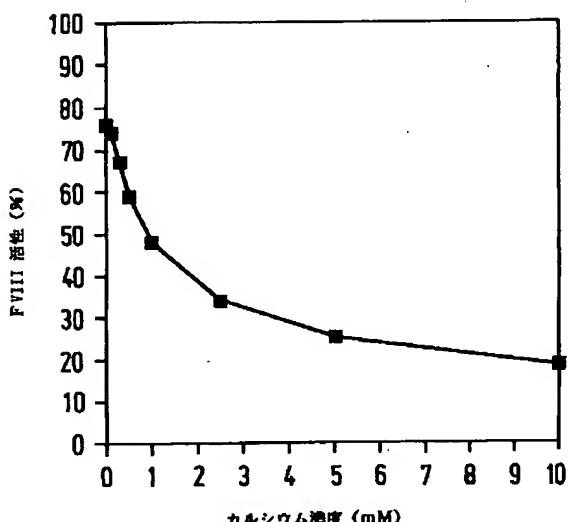
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

)

G 0 1 N 33/566
33/573

(31) 優先権主張番号 1 9 8 5 1 3 3 6 : 4

(32) 優先日 平成10年11月6日(1998. 11. 6)

(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

識別記号

F I

マークド(参考)

G 0 1 N 33/573

A 6 1 K 37/54

(31) 優先権主張番号 1 9 8 2 7 7 3 4 : 2

(32) 優先日 平成10年6月22日(1998. 6. 22)

(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

A

(31) 優先権主張番号 19903693:4
(32) 優先日 平成11年2月1日(1999. 2. 1)
(33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(72) 発明者 ハンス-アルノルト・シュテーア
ドイツ連邦共和国デー-35083ヴェター.
シュールシュトラーセ66
(72) 発明者 アネット・フォイスナー
ドイツ連邦共和国デー-35043マルブルク.
ランゲヴィーゼンヴェーク10